

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001年5月17日 (17.05.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
**WO 01/35093 A1**

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: **G01N 33/48**, 33/53, 33/68
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/07838
- (22) 国際出願日: 2000年11月8日 (08.11.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願平11/316475 1999年11月8日 (08.11.1999) JP  
特願2000/274257 2000年9月11日 (11.09.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): エーザイ株式会社 (EISAI CO., LTD.) [JP/JP]; 〒112-8088 東京都文京区小石川4丁目6番10号 Tokyo (JP).
- (73)-103 Kumamoto (JP). 足立尚登 (ADACHI, Naoto) [JP/JP]; 〒860-0078 熊本県熊本市京町1丁目7-35 Kumamoto (JP). 布井博幸 (NUNOI, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒860-0079 熊本県熊本市上熊本1丁目9-43 Kumamoto (JP). 渡辺啓祐 (WATANABE, Keisuke) [JP/JP]; 〒300-2617 茨城県つくば市吉沼3495-7 Ibaraki (JP).
- (74) 代理人: 遠山 勉, 外 (TOYAMA, Tsutomu et al.); 〒103-0004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマビル6階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): JP, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 遠藤文夫 (ENDO, Fumio) [JP/JP]; 〒862-0941 熊本県熊本市出水7丁目
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF DETECTING CELL DEATH AND DETECTION REAGENT

(54) 発明の名称: 細胞死の検出方法及び検出試薬

(57) Abstract: A method of detecting cell death which comprises quantitating cytochrome C in a bodily fluid and detecting cell death based on the value thus determined; a method of quantitating cytochrome C in a bodily fluid by the sandwich method; and a cytochrome C-assay reagent for quantitating cytochrome C in a bodily fluid by the sandwich method which contains an antibody against cytochrome C.

(57) 要約:

体液中のチトクロムCを定量し、定量値に基づいて細胞死を検出することを含む、細胞死を検出する方法、並びに、体液中のチトクロムCをサンドイッチ法により定量する方法、及び、チトクロムCに対する抗体を構成成分とする、体液中のチトクロムCをサンドイッチ法による定量用のチトクロムC測定試薬。

## 明細書

## 細胞死の検出方法及び検出試薬

## 技術分野

本発明は、細胞死の検出方法及び検出試薬に関する。

## 背景技術

骨髓移植後に起きる多臓器を傷害する疾患である移植片対宿主反応疾患（GVHD）や、血球が貪食細胞に貪食される疾患である血球貪食症候群（hemophagocytic syndrome; HPS）そのうち特にウイルス感染後に起こるウイルス関連血球貪食症候群（Virus associated hemophagocytic syndrome; VAHS）などは、臓器不全を生じ最後に死に到る重篤な病気である。現在これらの疾患の診断は、生検などによる細胞学診断が一般的であるが、検査における患者の苦痛、診断までの時間や操作法において欠点を持っている。

近年、GVHD及びHPSの主な原因が、生体内の細胞のアポトーシスによることが明らかになり、アポトーシスを検出することによりGVHD及びHPSを診断することが可能ではないかと考えられるようになった。

アポトーシスを検出する方法として、従来から1)形態学的方法、2)組織化学的方法、3)生化学的方法、及び、4)免疫化学的方法が用いられている。

1)形態学的方法：アポトーシスに特異的に生じるDNA断片化を染色法で検出するクロマチン凝縮判定法やアポトーシスに特有な形態的变化を電子顕微鏡観察や細胞サイズの測定により検出する方法が用いられている。

2)組織化学的方法：DNA断片の末端に、標識したヌクレオチドを結合させ、蛍光顕微鏡で検出する方法が用いられており、別法として、細胞内物質の量を個々の細胞について測定するフローサイトメトリー法を用いることも行われている。

3)生化学的方法：アガロースゲル電気泳動によりDNAラダーを検出する方法が用いられており、現在アポトーシスの最も確かな証明法とされているが、組織あるいは細胞群全体からDNAを抽出するのでアポトーシス細胞の割合が多くないと感度及び定量性に問題があると言われている。

4)免疫化学的方法：ヒストン結合DNA断片（モノヌクレオソームあるいはオリゴヌクレオソーム）を検出する固相酵素免疫検定法(ELISA)（セルデテクションELISA: Boehringer Mannheim, 国産化学）が開発されている。

しかしこれらの方法には、手技が複雑である、感度及び定量性が悪い等の問題点があり、GVHD及びHPSを診断する方法としては実用化に到っていないのが現状である。

## 発明の開示

本発明の課題は、生体内で起こっているアポトーシスを検出するための、簡便で感度及び定量性に優れた方法及び試薬を開発することにある。

チトクロムCは、ミトコンドリアにおける電子伝達系の重要な蛋白質として知られているが、細胞がアポトーシスの引き金となる刺激に曝され、アポトーシスの状態になると、ミトコンドリアにあったチトクロムCが急速にサイトゾルへと放出されることが報告されている（Dinsdale, D. et al., American J.Pathol. 155:607-18, 1999）。そしてサイトゾルのチトクロムCは、アポトーシスのキープクターであるカスパーゼ(caspase)-3の活性化に関与し、チトクロムCの増加が、アポトーシス進行と関係することが報告されている（Medina, V. et al., Cancer Research 57:3697-707, 1999）。

本発明者らは、生体内でアポトーシスが起これば、ミトコンドリアより放出されたチトクロムCが、血中でも測定できるのではないかと考えた。そして、チトクロムCを測定するELISAを確立し、血中のチトクロムCの量がGVHD、HPS、急性リンパ性白血病及びインフルエンザ脳症の進行と強く相関することを見出して、本発明を完成するに到った。

すなわち本発明は、下記のような、体液中のチトクロムCを定量することにより、生体内で起こっている細胞死を検出する方法、並びに、その方法に使用できるチトクロムCの測定方法及びチトクロムC測定試薬を提供する。

(1)体液中のチトクロムCを定量し、定量値に基づいて細胞死を検出することを含む、細胞死を検出する方法。

(2)チトクロムCを免疫化学的方法により定量する、(1)の細胞死を検出する方法。

- (3)体液中のチトクロムCをサンドイッチ法により定量することを含む、チトクロムCを測定する方法。
- (4)チトクロムCに対する抗体を構成成分とする、体液中のチトクロムCのサンドイッチ法による定量用のチトクロムC測定試薬。
- (5)細胞死の検出用である、(4)のチトクロムC測定試薬。
- (6)移植片対宿主反応疾患（GVHD）の診断用である、(4)のチトクロムC測定試薬。
- (7)血球貪食症候群（HPS）の診断用である、(4)のチトクロムC測定試薬。
- (8)急性リンパ性白血病の診断用である、(4)のチトクロムC測定試薬。
- (9)ウイルス性脳炎・脳症の診断用である、(4)に記載のチトクロムC測定試薬。
- (10)ウイルス性脳炎・脳症がインフルエンザ脳炎・脳症である、(10)に記載のチトクロムC測定試薬。

#### 図面の簡単な説明

図1は、HPS患者血清中のLDH、AST、ALT、フェリチン及びチトクロムC(Cyto-C)の値の推移を示す。

図2は、高熱、熱性けいれん及び脳炎・脳症を伴うインフルエンザ患者血清中のチトクロムC量を示す。

図3は、インフルエンザ脳症を発症した患者血中のGOT、LDH及びチトクロムCの値の推移を示す。

図4は、高熱、熱性けいれん及び脳炎・脳症を伴うインフルエンザ患者血清中の各種サイトカイン量を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下に本発明の実施の形態について詳細に説明する。

アポトーシスシグナルを受けて、ミトコンドリアから細胞質に移行したチトクロムCは、細胞死の結果、細胞膜が崩壊することにより細胞外へ放出されと考えられる。本発明は、細胞死により細胞外へ放出されたチトクロムCが、体液中例えば血液中のチトクロムCの定量によって検出可能であり、体液中のチトクロムCを定量することによって生体内で起こっている細胞死を検出できることを見

出したことに基づくものである。従って、体液中のチトクロム C を定量することにより、細胞死を検出する方法であれば、本発明に含まれるものである。

ここで細胞死とは、主にアポトーシスを指すものであるが、一般的に生体内で起こっている細胞死がアポトーシスであることを特定することは容易ではなく、体液中のチトクロム C の増加を伴う細胞死であれば、本発明における細胞死に含まれる。

また体液とは、生体より採取された血液、血漿、血清、脳脊髄液等を意味するものである。

チトクロム C を測定する方法としては、免疫化学的方法、電気泳動による方法、クロマトグラフィーによる方法等が考えられる。電気泳動による方法としては、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ってチトクロム C をバンドとして検出する方法、キャピラリー電気泳動でピークとして検出する方法等がある。また、クロマトグラフィーによる方法としては、高速液体クロマトグラフィーでピークとして検出する方法等がある。場合によっては感度を上げるために、蛍光標識することも許されるが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

チトクロム C を測定する方法としては、感度及び簡便性から免疫化学的方法が好ましい。ここで免疫化学的方法とは、チトクロム C に対する抗体を用いて、チトクロム C を定量する方法である。免疫化学的方法としては、チトクロム C を標識する競合法、抗体を標識するサンドイッチ法、抗体コートしたビーズの凝集を観察するラテックスビーズ法等、様々な方法があるが、チトクロム C に対する抗体を用いた方法であれば、本発明の好ましい態様に含まれる。抗体はモノクローナル抗体でも、ポリクローナル抗体でも良い。また標識する方法にも、放射性同位元素による標識、電気化学発光する化合物による標識、蛍光標識、酵素標識、ビオチン標識等、様々な方法があるが、本発明はこれらの例に限られるものではない。

チトクロム C を測定する免疫化学的方法の例として、以下にサンドイッチ法についてステップを追って説明する。

1)チトクロム C に対する抗体をビーズ又はカップ上に固相化する。ビーズはマイクロビーズでもよく、その場合は磁性体のマイクロビーズが好ましい。固相化は、

共有結合により結合させても非共有結合により結合させても構わない。通常、ビーズ又はカップ上の非特異的な結合部位をふさぐため、ウシ血清アルブミン (BSA)、カゼイン等の蛋白質、又は、Tween 20等の界面活性剤でブロッキング操作を行う。

2)検体を、必要であればBSA、カゼイン等の蛋白質、又は、Tween 20等の界面活性剤を含むバッファーで希釈し、ビーズ又はカップに加える。また、既知の量のチトクロムCも同様に希釈して加える。

3)ビーズ又はカップを、できればTween 20等の界面活性剤を含むバッファーで洗浄後、できればBSA、カゼイン等の蛋白質、又は、Tween 20等の界面活性剤を含むバッファーで希釈された標識抗体を加える。

4)ビーズ又はカップを、できればTween 20等の界面活性剤を含むバッファーで洗浄後、標識に応じた方法で測定する。例えば、放射性標識であれば放射活性を、酵素標識であれば酵素活性を測定する。また、ビオチン化標識であれば更に標識アビジンを加えて、標識に応じた方法で測定する。

5)既知量のチトクロムCから検量線を作成し、検体中に含まれるチトクロムC量を計算する。

以上のステップにより、検体中のチトクロムCが定量される。

チトクロムCの定量値が正常値よりも高い場合に、細胞死が検出されたとすることができる。

また本発明は、体液中のチトクロムCをサンドイッチ法により定量することを含むチトクロムCを測定する方法に関する。サンドイッチ法は、固定化抗体と標識抗体により抗原がサンドイッチされた状態を利用する、ELISAなどの免疫化学的方法である。

チトクロムCを免疫化学的方法により測定する方法としては、ドットブロット法が多く用いられている (Souichi A. et .al., J. Biological Chem. 273:1989 2-4, 1998)。しかしながら、この方法はチトクロムCの含有量が高く蛋白質濃度の低い細胞ホモジェネート中のチトクロムCは測定できても、チトクロムCの含有量が低く蛋白質濃度の高い体液中のチトクロムCを高感度に定量するには不向きであった。本発明は、蛋白質濃度の高い体液中のチトクロムCを高感度で定

量するために、サンドイッチ法のELISAを適用し、生体内で起こった細胞死で放出される程度に微量の、体液中のチトクロムCをも検出できることを見出したものである。

更に本発明は、チトクロムCに対する抗体を構成成分とする、体液中のチトクロムCをサンドイッチ法により定量するチトクロムC測定試薬にも関する。測定試薬は、抗体として抗チトクロムC抗体を用いる以外は、通常のサンドイッチ法に用いられる試薬（キット）と同様の構成でよい。その一例としてサンドイッチ法によりチトクロムCを測定する測定試薬は、例えば1)抗チトクロムC抗体コートカップ、抗チトクロムC抗体コートビーズなどの抗チトクロムC抗体コート固相、2)標識抗チトクロムC抗体、3)既知濃度のチトクロムC標準溶液、4)希釈液、5)洗浄液、を含有する試薬である。更に、酵素標識であれば、6)発色基質、7)反応停止液が含まれてもよい。

本発明で開示されるチトクロムCの測定方法及び測定試薬により、細胞死の検出が可能になる。従って、アポトーシスを伴う様々な疾患の、鑑別や経過観察などの診断のための指標を提供することが可能となる。従って、細胞死の検出やアポトーシスを伴う疾患の診断を目的とするチトクロムCの測定方法及び測定試薬が提供される。

ここでアポトーシスを伴う疾患とは、例えば以下の例があげられる。

- 1)生体防御を担う免疫系の細胞が発するシグナルにより、アポトーシスが引き起こされる疾患、例えばGVHD、自己免疫性疾患（全身性エリテマトーデス（SLE）、関節リウマチ(RA)、強皮症、シェーグレン症候群、多発性硬化症、インシュリン依存性糖尿病、潰瘍性大腸炎）。
- 2)ウイルス感染による細胞死、あるいはウイルスに感染した細胞に対して免疫系細胞が反応してアポトーシスが引き起こされる疾患、例えばウイルス関連血球貪食症候群（VAHS）、その他のウイルス感染（HCV、HIV、インフルエンザウイルス）。
- 3)異常なアポトーシスシグナルによる細胞死が引き起こされる疾患、例えば神経変性疾患（アルツハイマー病、パーキンソン病）。
- 4)白血病、例えば急性リンパ性白血病。
- 5)人為的にアポトーシスが引き起こされる疾患、例えば放射線照射、薬剤（抗ガ

ン剤など) 投与などに対するもの。

6)全身性炎症反応症候群 (SIRS) : 生体に対する侵襲に反応して非特異的に免疫系が活性化し、サイトカイン産生が制御不能になり臓器障害が発生する疾患 (HPS、重症肺炎) 。

ウイルス感染により引き起こされる疾患で、重篤でかつ後遺症として残りやすいのは、脳炎・脳症である。特にインフルエンザウイルスにより起こされる脳炎・脳症は、インフルエンザによる死亡原因の大きな割合を占めるにもかかわらず、熱性けいれんとの鑑別が難しく、的確な治療を行うための的確な早期診断の方法が求められている。本発明の測定方法及び測定試薬によれば的確な早期診断が可能になる。

体液中のチトクロム C を測定することにより、生体内で進行している細胞死を測定することが可能となり、これら疾患の進行をモニターすることができる。特にGVHD、血球貪食症候群 (HPS)、中でもウイルス関連血球貪食症候群 (VAHS)、急性リンパ性白血病、及びインフルエンザ脳炎・脳症では、病状を把握するためにチトクロム C を定量することは有用である。

発明者らによる更なる研究の結果、HPS及びインフルエンザ脳症において、血中チトクロム C の量が細胞死の指標とされるLDHと良く相関することが確かめられ、更にチトクロム C が、LDHに先行して増加及び減少することが明らかにされた。

体液中のチトクロム C は、生体内で起こっている細胞死の良い指標であり、病態を早く的確に知るための有用な指標となり得る。

## 実施例

以下に、具体的な例をもって本発明を示すが、本発明はこれに限られるものではない。％は、特記しない限り質量％である。

### [実施例 1] チトクロム C のELISAによる測定

チトクロム C の測定法は、以下の手順で実施する。

#### 1)抗チトクロム C 抗体の精製

ラットのチトクロム C (シグマ社) をウサギに免疫し、チトクロム C に対する



抗血清を得る。その抗血清に最終濃度2 Mになるように硫安を添加し、室温（20～30℃）で5時間攪拌する。攪拌した溶液を10000回転で30分遠心し上清を捨て、沈殿物を0.1 Mリン緩衝液pH 7.2で溶解後、同一緩衝液に対して透析する。透析した溶液は、CNBr-Sepharose 4B（ファルマシア社）にウシのチトクロムCを結合させて得た担体のカラムに流す。0.15 M NaClを含む0.01 Mトリス塩酸緩衝液pH 7.5でカラムを洗浄後、0.1 M塩酸グアニジンで抗チトクロムC抗体を溶出し、溶出液を、0.15 M NaClを含む0.01 Mトリス塩酸緩衝液pH 7.5に対して透析し抗体(IgG)精製物とする。

## 2)抗チトクロムC抗体F(ab')<sub>2</sub>の調製

精製したIgGを0.1 M酢酸緩衝液pH 4.2に対して透析する。透析したIgG溶液にペプシン（シグマ社）を質量濃度比で20:1の割合になるように加え、37℃で16時間反応させる。反応後の溶液のpHを1 N NaOHで7.5に調整した後、0.15 M NaClを含む0.01 Mトリス塩酸緩衝液pH 7.5で平衡化したSephacryl S-200（ファルマシア社）カラムでゲル濾過を行う。ゲル濾過したフラクションの第一ピークを集め、濃縮し抗チトクロムC抗体F(ab')<sub>2</sub>液とする。

## 3)西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識抗チトクロムC抗体F(ab')<sub>2</sub>抗体の作製

4 mg/mlに調整したHRP（東洋紡）溶液の1 mlに0.1 Mメタ過ヨウ素酸ナトリウムを60 μl加え、室温（20～30℃）で20分攪拌後、0.001 M酢酸緩衝液pH 4.4に対して透析する。透析後、0.2 M炭酸ナトリウム液でpH 9.0～9.5に調整する。この溶液に0.1 M炭酸緩衝液pH 9.5に対して透析した抗チトクロムC抗体F(ab')<sub>2</sub>溶液（4 mg/ml）を1 ml加え、室温（20～30℃）で2時間攪拌する。4 mg/mlに調整した水素化ホウ素ナトリウム液を50 μl加え、4℃で2時間攪拌後、16時間静置保存する。この溶液を0.15 M NaClを含むリン酸緩衝液 pH 7.2に対して透析後、Sephacryl S-200（ファルマシア社）カラムでゲル濾過を行う。ゲル濾過したフラクションの第一ピークを集め、25% ウサギ血清（日本生物材料）を含む0.2 Mリン酸二ナトリウム緩衝液pH 5.4で希釈し、HRP標識抗チトクロムC抗体F(ab')<sub>2</sub>液（標識抗体液）とする。

## 4)抗チトクロムC抗体固相化カップの作製

1)で得られたIgG精製物を、0.01 Mトリス塩酸緩衝液pH 7.5で吸光度0.1に調整

する。この抗体溶液を、ポリスチレンカップに100 $\mu$ l注入し4℃で16時間反応させた後、EIA法専用洗浄機によって0.15 M NaCl及び0.01% Tween 20を含む0.01 M トリス塩酸緩衝液pH 7.5で3回（各4秒間）洗浄する。洗浄したカップに、0.5%ウシアルブミンを含む0.01 M トリス塩酸緩衝液pH 7.5を200 $\mu$ l加え、再度4℃で16時間反応させ固相化カップとする。

#### 5)標準抗原の調製

ラットのチトクロム C（シグマ社）を、2% BSA、0.01 M EDTA 2Na、0.1% NaN<sub>3</sub>、0.01% Tween 20及び0.15 M NaClを含む0.05 M トリス緩衝液pH 7.5で希釈し、50 ng/ml～0.05 ng/mlの希釈液を作製する。

#### 6)測定

抗チトクロム C抗体を固相化したカップ中のウシアルブミン液を吸い取り、全カップに、2% BSA、0.01 M EDTA 2Na、0.1% NaN<sub>3</sub>、0.01% Tween 20及び0.15 M NaClを含む0.05 M トリス緩衝液pH 7.5を50 $\mu$ l注入する。そのカップに標準抗原希釈液及び検体を50 $\mu$ l加え、室温（20～30℃）で1時間反応させる。反応後、EIA専用洗浄機を用い、0.01% Tween 20、0.0015 M NaCl、0.0015% パラオキシ安息香酸メチル及び0.005% 2-クロロアセトアミドを含む0.005 M トリス緩衝液pH 7.5で3回（各4秒間）洗浄する。洗浄後、標識抗体液を100 $\mu$ l加え室温（20～30℃）で1時間反応させる。反応後、EIA専用洗浄機を用い0.01% Tween 20、0.15 M NaCl、0.0015% パラオキシ安息香酸メチル及び0.005% 2-クロロアセトアミドを含む0.005 M トリス緩衝液pH 7.5で3回（各4秒間）洗浄する。洗浄後、1.5 mg/mlのABTS（2,2-アジノ-ビス-(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)を含む 0.1 Mクエン酸緩衝液pH 4.2を100 $\mu$ l加え室温（20～30℃）で1時間反応させ、次いで0.013% NaN<sub>3</sub>液を100 $\mu$ l加え反応を停止する。発色した溶液の405nmの吸光度を分光光度計で測定する。

#### 7)標準抗原曲線の特性

各濃度のチトクロム C及び検体の吸光度値からブランクの吸光度値を引く。横軸に標準抗原濃度、縦軸は標準抗原の吸光度をプロットし、標準曲線を描く。その標準抗原曲線を基に、検体中に含まれるチトクロム C量を計算する。

[実施例 2] GVHD、HPS及び急性リンパ性白血病患者血清中のチトクロム C の定量

実施例 1 に記載したチトクロム C の ELISA 系を用いて、GVHD、HPS 及び急性リンパ性白血病患者並びに健常人の血清中のチトクロム C 量を測定した。

その結果、表 1 に示すように、健常人 15 人では全て陰性 (< 0.05 ng/ml) であったが、GVHD では 6 例中 4 例 (67%)、HPS では 4 例中 4 例 (100%)、急性リンパ性白血病では 2 例中 2 例 (100%) が陽性であった。また HPS では、血中チトクロム C 濃度の高い患者で、予後が悪い傾向が見られた。

アポトーシスが起こっていると考えられる患者の血清中では、明らかなチトクロム C 定量値の高値が認められた。

表 1

GVHD、HPS 及び急性リンパ性白血病患者血清中チトクロム C の定量値

疾患名	血清中チトクロム C の定量値 (ng/ml)
GVHD	1.1
	<0.05
	0.4
	0.3
	<0.05
	0.3
HPS (VAHS を含む)	3.1
	22.0
	38.0
	2.9
急性リンパ性白血病	0.4
	0.4
健常人 *	<0.05

\*: 健常人 15 人は全て検出限界以下 (<0.05 ng/ml) であった。

また図 1 には HPS 患者血清中の、LDH、AST、ALT、フェリチン及びチトクロム C

の値の推移を示した。チトクロム C は LDH の値とほぼ相関し、更に LDH に先行して推移して、病態の変化を鋭敏に捉える指標として有用であると考えられる。

#### 〔実施例 3〕 インフルエンザ脳炎・脳症患者血清中のチトクロム C の定量

実施例 1 に記載した ELISA 系を用いて、インフルエンザ患者のうち、高熱、熱性けいれん及び脳炎・脳症を伴った患者の血清中のチトクロム C 量を測定した。

図 2 に、1 症例で複数回測定した場合も含めて結果を示す。脳炎・脳症を伴った例では、全 27 検体（8 例）が 5 ng/ml 以上の高値を示し、その中でも 17 検体が 30 ng/ml 以上の高値を示していた。また、血中チトクロム C の濃度が高い患者で、予後が悪い傾向が見られた。

熱性けいれんを繰り返していた患者の中にやや高値を示す患者がおり、これらの患者については、十分な注意が必要であろうと考えられた。高熱を伴う患者では、高値のチトクロム C 定量値を示した患者がいなかった。

また図 3 には、インフルエンザ脳症を発症した患者の、血中 GOT、LDH 及びチトクロム C の値の推移を示す。チトクロム C は LDH に先行して上昇及び下降し、チトクロム C が脳症のインフルエンザ脳症の病態を反映する、先行指標として有用であることが示された。

#### 〔実施例 4〕 インフルエンザ脳炎・脳症患者血清中の各種サイトカイン濃度

高熱、熱性けいれん及び脳炎・脳症を伴ったインフルエンザ患者の血清中の、E-セレクトリン(selectin)、可溶性トロンボモジュリン(soluble thrombomodulin) (sTM)、腫瘍壊死因子(TNF)、Fas、FasL 及びチトクロム C の濃度を定量した。E-セレクトリンは sE-セレクトリン ELISA キット (version 2、Bender med systems 社製)、sTM は TM テスト (Teijin Diagnostics 社製)、TNF は ヒト TNF- $\alpha$  サイトスクリーン イムノアッセイキット (Bioscience International 社製)、Fas は sFas ELISA キット、FasL は sFas リガンド ELISA キット (共に Medical and Biological Laboratories 社製) にて測定し、チトクロム C は実施例 1 に記載した ELISA 系を用いて測定した。

図 4 に示すように、どのサイトカインも脳炎・脳症患者血清中で高値を示す例

が増加したが、チトクロム C が脳炎・脳症で最も顕著に増加し、脳炎・脳症の鑑別にはチトクロム C が最も適していることが示された。

#### 産業上の利用の可能性

本発明により、体液中のチトクロム C を定量するのに適した免疫化学的方法が提供される。また、チトクロム C は生体内で起こっている細胞死の良い指標であり、病態を早く的確に知るための有用な指標であることが明らかにされ、従って、チトクロム C の測定は、アポトーシスが病態の進行に関わる疾患、特に GVHD、HPS、急性リンパ性白血病及びインフルエンザ脳炎・脳症の、鑑別及び経過観察などの診断に有用である。

## 請求の範囲

1. 体液中のチトクロム C を定量し、定量値に基づいて細胞死を検出することを含む、細胞死を検出する方法。
2. チトクロム C を免疫化学的方法により定量する、請求項 1 に記載の細胞死を検出する方法。
3. 体液中のチトクロム C をサンドイッチ法により定量することを含む、チトクロム C を定量する方法。
4. チトクロム C に対する抗体を構成成分とする、体液中のチトクロム C のサンドイッチ法による定量用のチトクロム C 測定試薬。
5. 細胞死の検出用である、請求項 4 に記載のチトクロム C 測定試薬。
6. 移植片対宿主反応疾患の診断用である、請求項 4 に記載のチトクロム C 測定試薬。
7. 血球貪食症候群の診断用である、請求項 4 に記載のチトクロム C 測定試薬。
8. 急性リンパ性白血病の診断用である、請求項 4 に記載のチトクロム C 測定試薬。
9. ウイルス性脳炎・脳症の診断用である、請求項 4 に記載のチトクロム C 測定試薬。
10. ウイルス性脳炎・脳症がインフルエンザ脳炎・脳症である、請求項 9 に記載のチトクロム C 測定試薬。

1/4

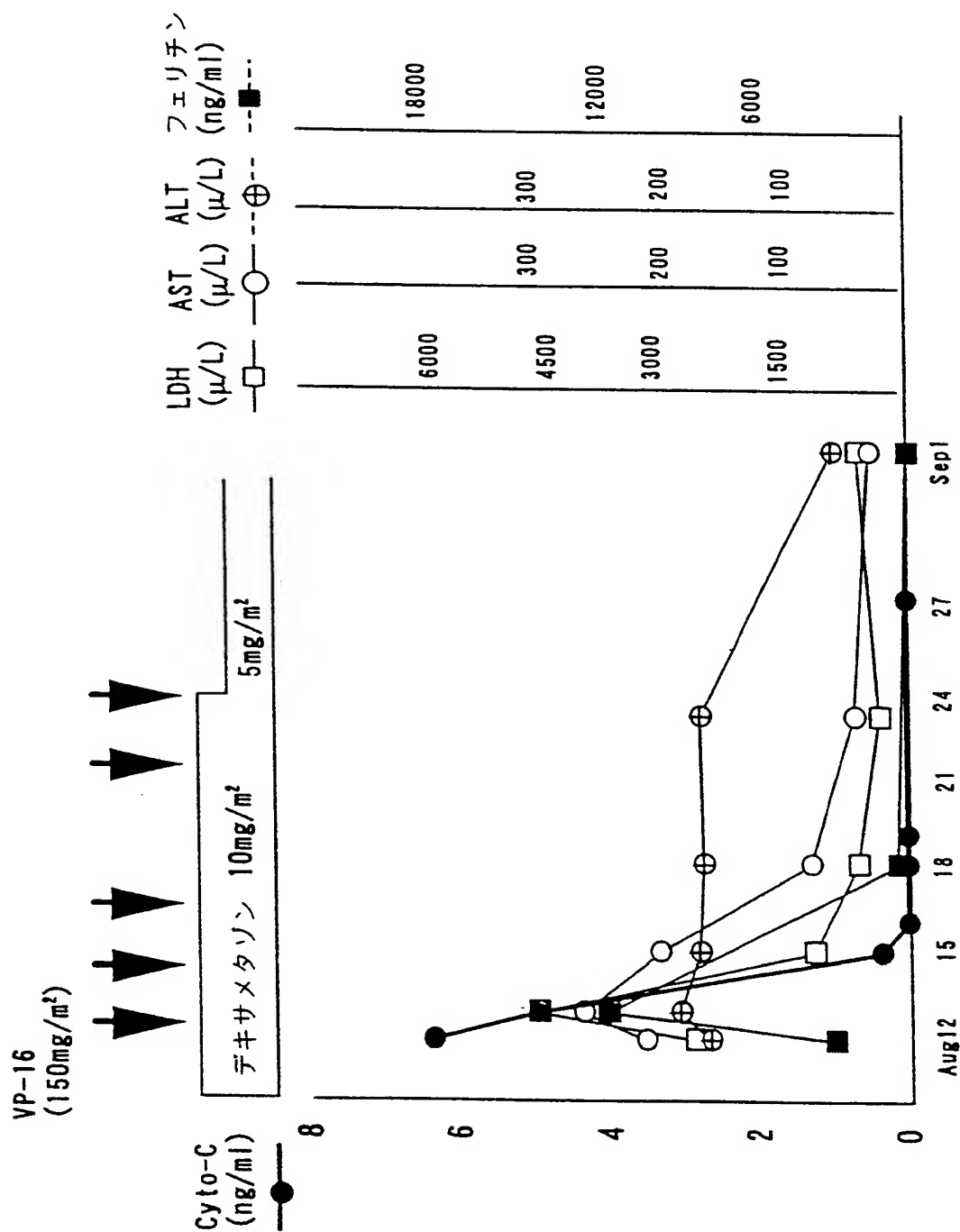


図 1

熱性痙攣と脳炎・脳症の鑑別

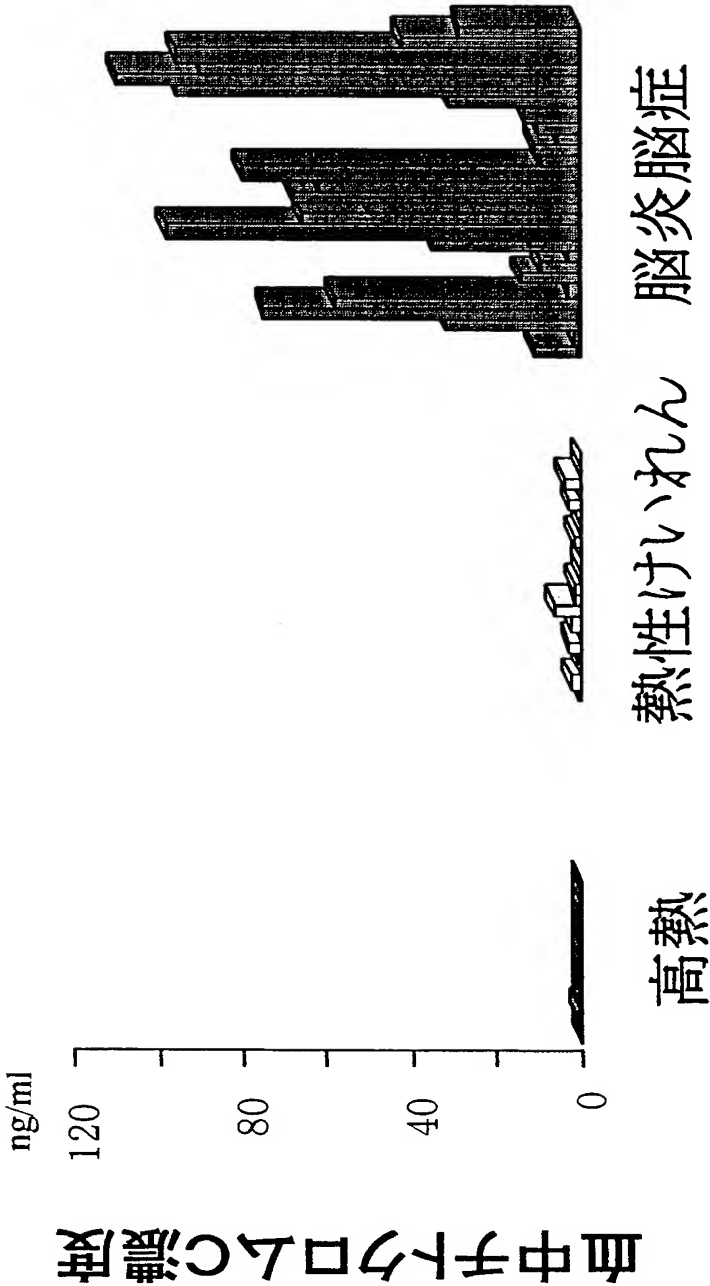


図 2



入院一週間の経過

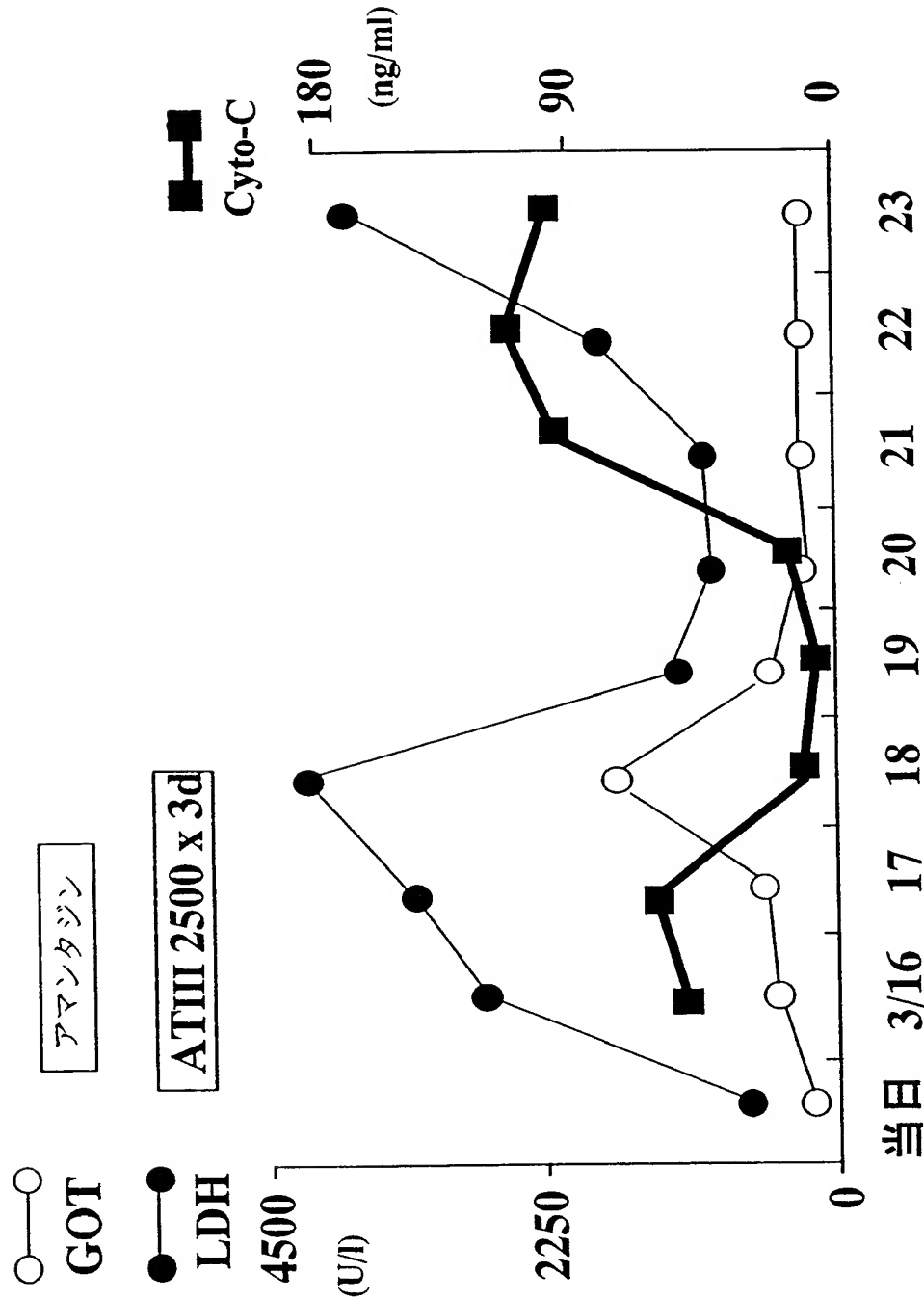


図 3

# インフルエンザ重症度と各サイトカイン濃度

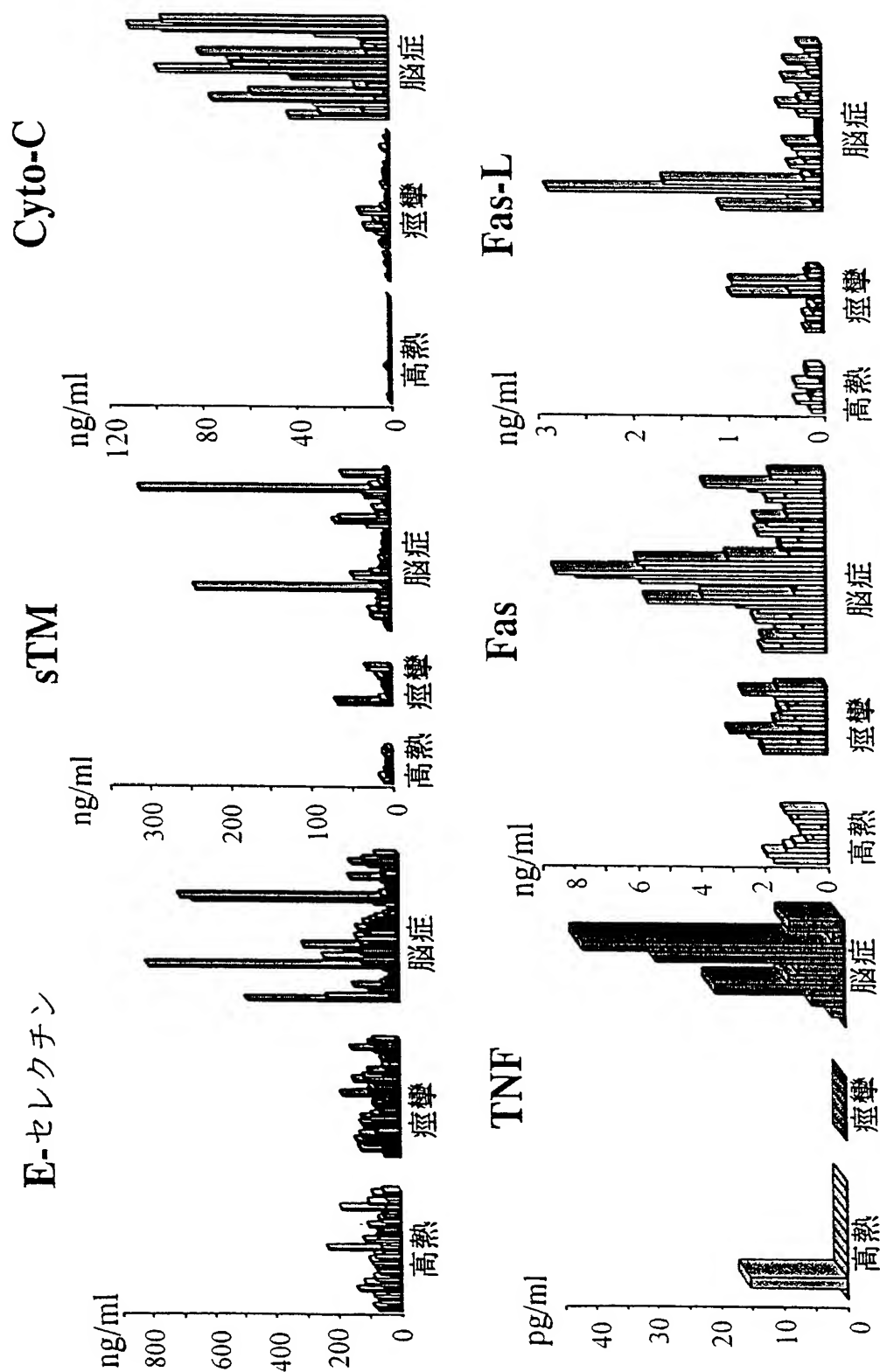


図 4

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07838

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> G01N 33/48, G01N 33/53, G01N 33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> G01N 33/48, G01N 33/53, G01N 33/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X /A	JP, 3-257367, A (Morinaga Seika K.K.), 15 November, 1991 (15.11.91) & GB, 2241782, A	3, 4 /1, 2, 5-10
A	BIOSIS NO.:199900013224 & J. Cerebral Blood Flow and Metabolism, Vol.18, No.11, pp.1239-1247 (1998)	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05 January, 2001 (05.01.01)

Date of mailing of the international search report

16 January, 2001 (16.01.01)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> G01N 33/48, G01N 33/53, G01N 33/68

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> G01N 33/48, G01N 33/53, G01N 33/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, BIOSIS

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X /A	JP, 3-257367, A (森永製菓株式会社) 15. 11月. 1991 (15. 11. 91) & GB, 2241782, A	3, 4 /1, 2, 5-10
A	BIOSIS NO. :199900013224 & J. Cerebral Blood Flow and Metabolism, Vol. 18, No. 11, P. 1239-1247 (1998)	1-10

☐ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05.01.01

国際調査報告の発送日

16.01.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

印

2J

9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3252